

シロクローバにおける基礎的育種技術の開発研究

著者	山田 敏彦
号	398
発行年	1990
URL	http://hdl.handle.net/10097/16223

氏 名(本籍) やま 山 だ 田 とし 敏 ひこ 彦

学 位 の 種 類 博 士 (農 学)

学 位 記 番 号 農 第 3 9 8 号

学位授与年月日 平 成 2 年 10 月 18 日

学位授与の要件 学位規則第 5 条第 2 項該当

学 位 論 文 題 目 シロクローバにおける基礎的育種技術の
開発研究

論 文 審 査 委 員 (主 査) 教 授 日 向 康 吉
教 授 星 川 清 親
教 授 菅 洋

論文内容要旨

第1章. 緒論

シロクローバ(Trifolium repens L.)は最も重要なマメ科牧草の1つで、良質な蛋白やミネラルの含量が高く優れた粗飼料として、また、共生する根粒菌による窒素の固定能が高いことから、世界各地の草地でイネ科牧草と混播で栽培されている。わが国でも北海道から九州に至るまで広く栽培されているが、現在の品種では草地からの消失など問題が多く、既存の品種より優れた画期的な新品種が求められている。本研究では、シロクローバの新品種育成のための基礎的知見を得ることを目的として、まず、シロクローバ及びTrifolium属における遺伝的特性を解明し、次に、シロクローバの集団中から自家和合性因子を発見し、近交を利用した効率的な循環選抜法を提案し、更に、中間母本作出のための胚珠培養法や超低温保存法など各種の組織培養技術を開発して育種への適用を検討した。

第2章. シロクローバ及びTrifolium属の遺伝的特性

OECD（経済協力開発機構）登録品種を中心に102品種の育成国、品種のタイプ、育種母材、育種方法、品種特性を調査し、わが国の育種目標について考察した。次に、世界各地から導入した品種にキタオオハを加えたシロクローバ46品種の特性を評価した。小葉長、葉柄長、茎の太さなどの形態を示す形質間に高い相関関係がみられた。主成分分析の結果、第1主成分は形態の大きさを示す形質を表し、第2主成分は、植物体の草勢に関する形質及び開花期を説明した。第1及び第2主成分スコアの散布図ではシロクローバの品種は、ラジノ、大型のコモン、小型のコモン及びワイルド型の4群に分かれた(Fig. 1)。

次に、Trifolium属全体の変異に関する知見を得るために、8節(Lotoidea, Paramesus, Mistyllus, Vesicaria, Chronosemium, Trifolium, Trichocephalum及びInvolucrarium)を

含む67種、76系統・品種の特性調査を行った。多年生の種には小葉が大きく、草丈も高く、草型はほふく型を示すものが多かった。主成分分析を行ったところ、第1主成分は種子及び子葉の大きさを、第2主成分は生育習性、小葉の大きさ及び草丈を説明していた。Trichocephalum、Chronosemium節の種は、明瞭な群別ができた(Fig. 2)。また、Trifolium属の54種におけるパーオキシダーゼ及びエステラーゼアイソザイムに基づいて、クラスター分析を行い、系統樹を作成した(Fig. 3)。Lotoidea節は節内における種間の類似度が他の節と比較して低く、節内における変異が大きかった(Table 1)。このことは、Lotoidea節から他の節が派生したというこれまでの説を支持していると考えた。

第3章. 自家和合性の分析とその育種への利用

配偶体型自家不和合性植物のシロクロバでは自家受精と他家受精の両者をコントロールすることが容易でないため、効率的な選抜法と考えられている近交を利用した循環選抜法の適用が困難とされてきた。本研究ではシロクロバの育種へ循環選抜法を適用するために、自家和合性因子について検討した。

シロクロバ集団の各個体を自家受粉して自殖の可能性を調査したところ、集団全体の約25%の個体で自殖種子が得られた。その中で、MS2125-15の個体では多くの自殖種子が後代でも安定して得られ、自家和合性であった。この植物体の自殖第2代と品種「キタオオハ」の個体間で交雑を行い、自家和合性因子の遺伝分析を行った(Table 2)。F₃までの分析結果は自家和合性因子が単一の優性遺伝子であることを支持し、この因子はS遺伝子座の突然変異した対立遺伝子S'の可能性が高いと考えられた。シロクロバは四倍体植物であるが、自家和合性因子は二倍体的遺伝様式を示した。なお、この自家和合性植物は人為ト

リッピングなしで自殖が可能であり、実際の育種に利用できると考えられた。

シロクローバの柱頭組織を二次元電気泳動法で分析したところ、自家不和合性植物には塩基性で分子量35,000～40,000のタンパク質があり、自家和合性植物にはみられなかった。これらのタンパク質が自家不和合性に関与している可能性を示した。

自家和合性因子を用いて自殖を繰り返すと、近交弱勢があらわれた。特に圃場で選抜しない系統では栽培2年目までにはほとんどの個体が消失したことから、シロクローバでは近交弱勢が著しいことを指摘した。しかしながら、近交弱勢の程度の低い自殖後代系統も一部にみられた。自殖後代を交雑すると雑種強勢の効果があらわれ、親集団と同等ないしそれ以上の特性を示した(Table 3)。本研究から、自家和合性因子を用いて自殖を行い、その自殖後代を合成すると雑種強勢の効果があらわれ、集団が改良されることを明らかにした。

第4章. 組織培養技術の育種への利用

シロクローバの育種へ組織培養技術を適用するため、組織培養技術の基礎となるカルス及びプロトプラストからの植物体再分化技術の開発、近縁種の有用な特性を導入した中間母本作成のための胚珠培養法及び細胞融合法の開発、遺伝資源の安定的長期保存のための in vitro 低温及び超低温保存技術の開発などについて検討した。

1. 組織培養法の開発

シロクローバ24品種における胚軸由来カルスの再分化能を検討した。どの品種の胚軸からもカルスを容易に誘導できた。カルスの再分化能には遺伝子型特異性が存在し、わずかに2つの遺伝子型でのみシュート形成がみられた。特に、スウェーデンの品種「Undrom」由来カルスは、約3年以上にわたる継代培養後でも、その高い再分化能は保持されていた。

この培養系統由来のプロトプラストは8 P培地に0.5mg/l 2,4-Dと0.5mg/l カイネチンの組み合わせで分裂頻度が最も高く、また、容易に植物体を再生することができた。このように選抜した遺伝子型を用いることによりプロトプラストからの植物体再生が可能であった。この再分化能の高い遺伝子型は、今後、遺伝子操作などで有用な材料になると考えた。

Trifolium属の65種についてカルス培養を行った。植物体の初期生育速度の速い種はそうでない種に比べ、また、一年生の種は多年生のものに比べ、概してカルスの生育速度が大きい傾向がみられた(Table 4)。植物体に再分化したのは65種のうち10種であり、そのうち7種では最初の再分化の報告である。

2. 組織培養技術を用いた種間交雑法の開発

モザイク病抵抗性であるクラクローバ(T. ambiguum M. Bieb.)とシロクローバとの種間交雑では、胚发育の比較的初期段階である球状胚以降に雑種胚が崩壊するが、胚珠培養法を用いることにより雑種植物を得ることができた(Table 5)。雑種植物は両親のほぼ中間の形態を示し、アイソザイム分析などから雑種性が検定された。また、モザイク病抵抗性であった。雑種植物は花粉稔性が極めて低く、シロクローバとの戻し交雑の場合にのみわずかな種子を得た。戻し交雑個体は形態的にはシロクローバに類似し、モザイク病抵抗性であった。この方法によって、モザイク病抵抗性中間母本を作成できる可能性を示唆した。

鼓脹症を引き起こさないシロクローバを開発する目的で、再分化能を有するシロクローバプロトプラストをヨード酢酸処理して、再分化能のないラビットフットクローバ(T. arvense L.)プロトプラストと細胞融合を行った。再分化培地で一部のカルスに緑色斑点が形成されたが、その後褐変して植物体を得ることはできなかった。

3. 組織培養を用いた遺伝資源保存技術の開発

シロクロローバは他殖性植物であるため、有用な遺伝子型は栄養系で保存する必要がある。そこで、ウイルスフリー化の手法として茎頂培養法を開発した(Table 6)。次に、In vitro茎頂組織の低温下での保存を検討し、約1年間は安定して保存することができたが、その後、生存率の急速な低下がみられた(Table 7)。一方、カルスは3ヶ月間低温下で安定して生存することができたが、その後、急速に生存率が低下した。

プログラムフリーザーを用いた緩速冷却による超低温保存技術を検討した。茎頂組織を5%DMSOと5%グルコースを含む培地で、低温条件で前培養したとき、凍結抵抗性が向上した。凍結融解後は、液体培地で洗浄しない方が生存率は向上した。茎頂組織を液体窒素中で10ヶ月間まで保存したが、生存率はほぼ一定であった。今回開発した方法では、品種の耐寒性の強弱に関係なく、高い生存率が得られた(Table 8)。一方、カルスの場合は、ソルビトールによって培地の浸透圧を高めると凍結融解後の増殖率が向上し、シュート形成がみられた。次に、簡易法による超低温保存を検討し、3Mグリセリンを用いた脱水処理により、カルスでは高い細胞の生存率を得た(Table 9)。また、前培養した茎頂組織では約半数が生存した。以上、茎頂組織ではプログラムフリーザー法により、また、カルスにおいては簡易法によっても高い生存率を得たことから、超低温保存法の実用化の可能性を示唆した。

以上の育種技術の開発研究を基にして、遺伝資源から素材集団をつくり、組織培養技術によって遺伝的変異を拡大して基礎集団とし、自家和合因子を用いた効率的な循環選抜法(Fig. 4)を利用してシロクロローバの優良な品種を育成する育種計画を提案した。

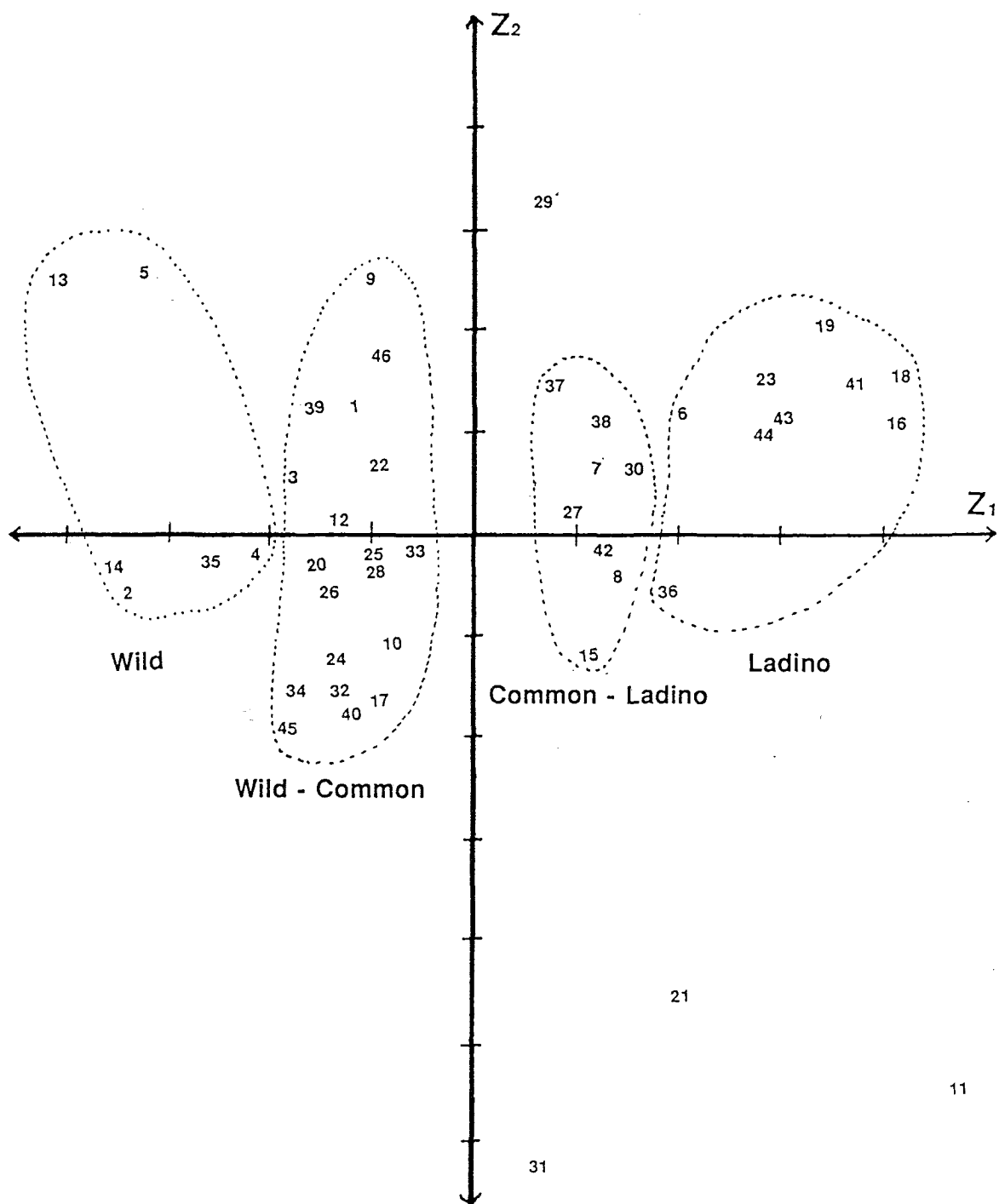


Fig. 1. Scatter diagram of cultivars of white clover following principal component analysis

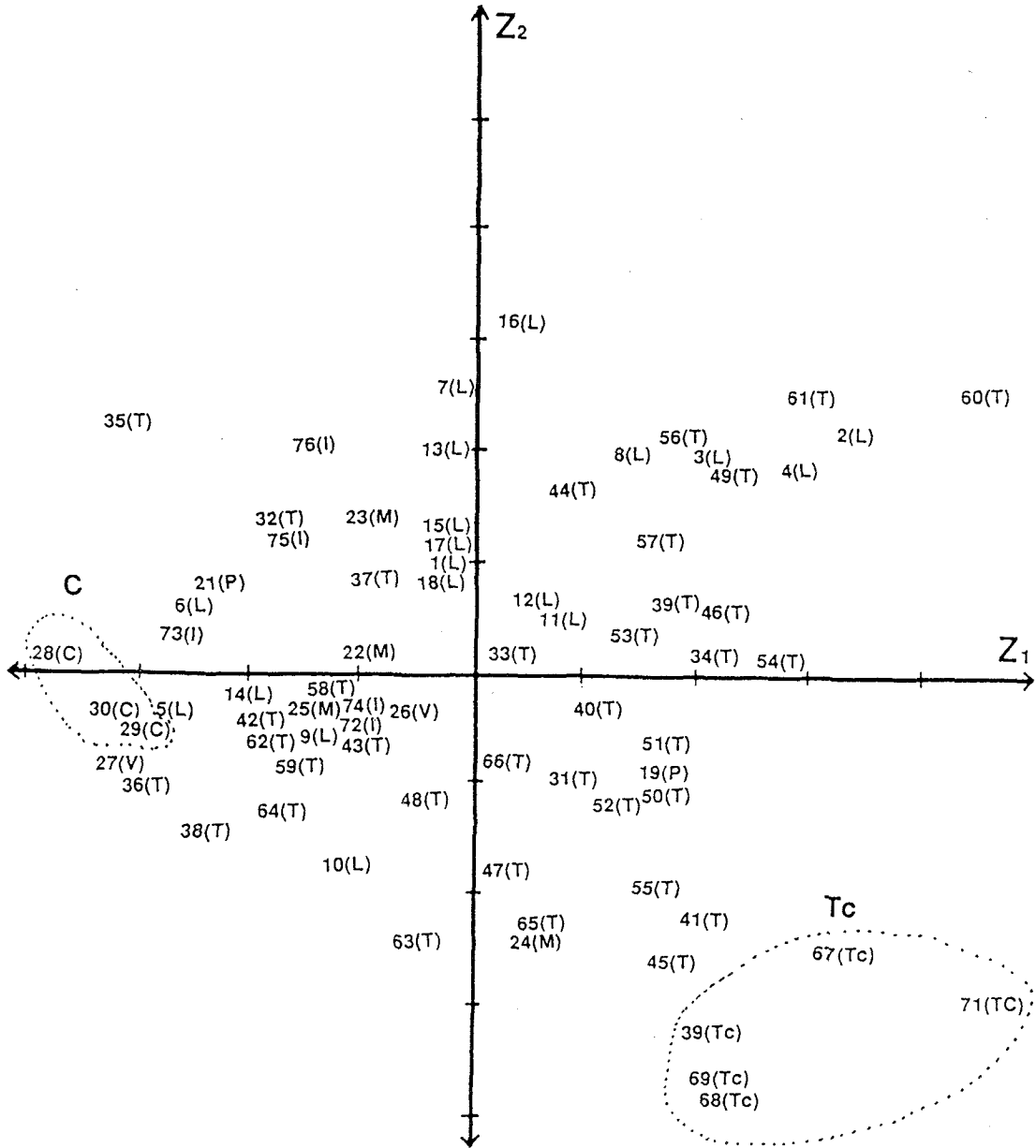


Fig. 2. Scatter diagram of 76 strains of 67 species in *Trifolium* following principal component analysis

Section:

L. *Lotoidea*, T: *Trifolium*, P: *Paramesus*, M: *Mistyllus*,
V: *Vesicaria*, C: *Chronosemium*, Tc: *Trichocephalum*,
I: *Involucrarium*

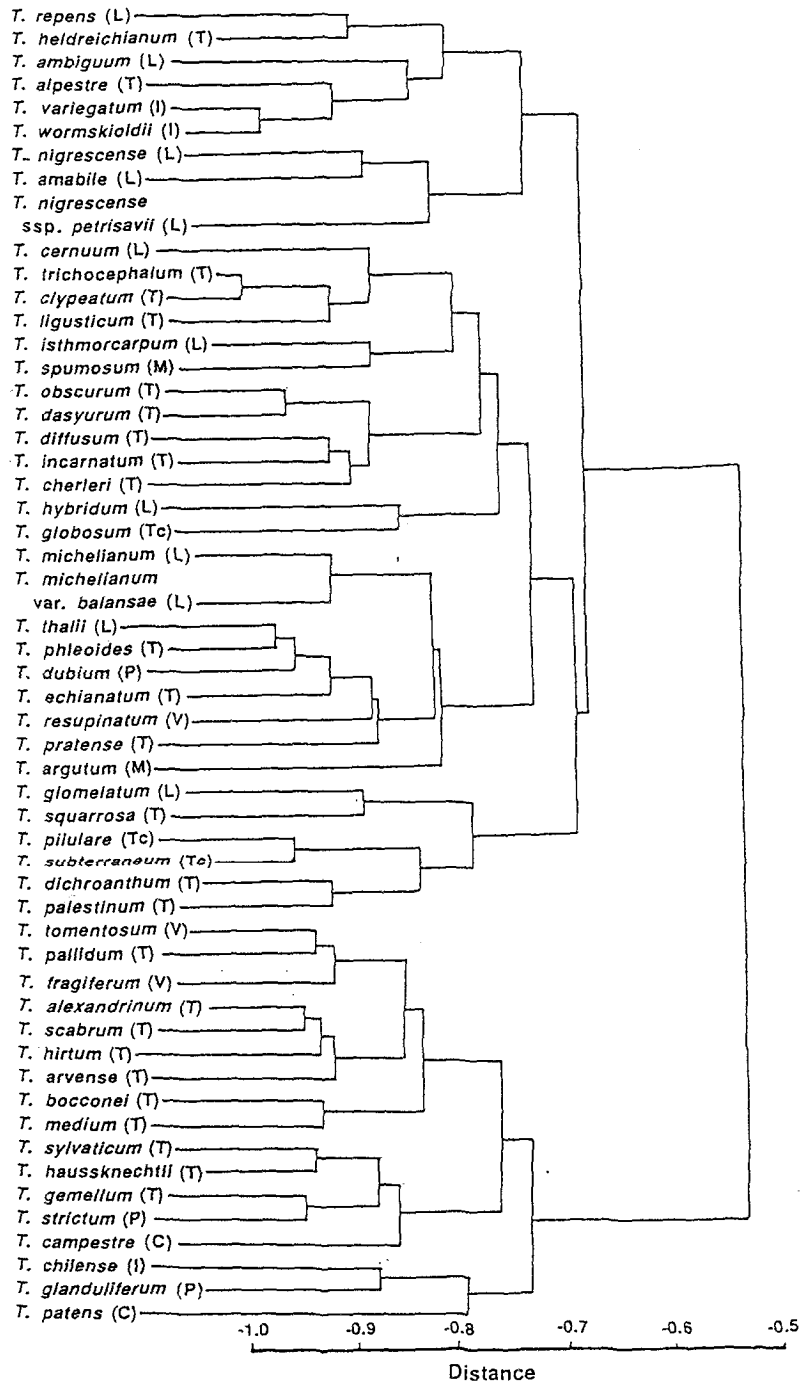


Fig. 3. Results of a cluster analysis on 54 strains of 52 species in *Trifolium* based on peroxidase and esterase isozymes.

Section:

L: *Lotoidea*, T: *Trifolium*, P: *Parameus*,
M: *Mistyllus*, V: *Vesicaria*, C: *Chronosemium*,
Tc: *Trichocephalum*, l: *Involucrarium*

Table 1. Average matching coefficients of peroxidase and esterase isozymes between species among eight sections of genus *Trifolium*.

Section	(1)	(2)	(3)	(4)	(5)	(6)	(7)	(8)
<u>Lotoidea</u> (1)	<u>0.618</u>							
<u>Paramesus</u> (2)	0.611	<u>0.711</u>						
<u>Mistyllus</u> (3)	0.620	0.572	<u>0.633</u>					
<u>Vesicaria</u> (4)	0.624	0.704	0.628	<u>0.778</u>				
<u>Chronosemium</u> (5)	0.542	0.667	0.483	0.611	<u>0.732</u>			
<u>Trifolium</u> (6)	0.644	0.694	0.627	0.709	0.599	<u>0.711</u>		
<u>Trichocephalum</u> (7)	0.643	0.637	0.661	0.578	0.411	0.648	<u>0.822</u>	
<u>Involucrarium</u> (8)	0.618	0.659	0.583	0.711	0.600	0.657	0.563	<u>0.733</u>

The value underlined shows average coefficient between all pairs of species within section.

The coefficient between sections indicates the average of the values of all pairs of species in both sections.

Table 2. Segregation of self-compatible(SC) and self-incompatible(SI) plants in F₁ and F₂ progeny derived from crosses between three plants of the cultivar "Kitaooha" and three SC plants of S₂ progeny of MS2125-15. Number of self-set seeds per head in F₁ by tripping(T) and non-tripping(NT) is also shown.

Cross	F ₁		F ₂		Average number of self-set seeds per head* in F ₁	
	SC	SI	SC	SI	T	NT
Kitaooha A × S ₂ (MS2125-15)-3	14	10	21	8	32	40
Kitaooha A × S ₂ (MS2125-15)-5	5	9	26	4	-	63
Kitaooha A × S ₂ (MS2125-15)-10	9	14	31	8	58	38
Kitaooha B × S ₂ (MS2125-15)-3	14	12	30	10	30	13
Kitaooha B × S ₂ (MS2125-15)-5	14	12	31	8	58	21
Kitaooha B × S ₂ (MS2125-15)-10	7	8	28	12	60	27
Kitaooha C × S ₂ (MS2125-15)-3	8	15	11	6	20	15
Kitaooha C × S ₂ (MS2125-15)-5	8	9	30	8	27	26
Kitaooha C × S ₂ (MS2125-15)-10	10	8	26	13	50	43
Total	89	97	234	77		
	(93)	(93)	(233)	(78)		
	X ² =0.344		X ² =0.017			

() : expected.

*) The average number of self-set seeds was obtained from ten flower heads.

Table 3. Characteristics of the progenies of the hybrids between SI plants of cultivar "Kitaooha" and SC plants (S₂ of MS2125-15) and their parent plants.

Population	Plant width (cm)		Stolon density 1)	Winter hardiness 2)	Leaflet length (cm)	Petiole length (cm)	Number of florets
	(Aug. 11th)	(Nov. 10th)					
Parents							
SI plants (Kitaooha)	96.2a	137.9a	3.9b	3.8a	3.24a	12.88a	84.7a
SC plants (MS2125-15)	26.9d	31.9c	2.0d	1.0c	1.14c	3.04c	34.9d
F ₂ generation							
F ₁ selfed progeny	61.2b	81.2b	3.0c	2.4b	2.27b	8.34b	62.4b
F ₃ generation							
F ₂ selfed progeny	49.0c	67.1b	2.9c	2.0b	2.34b	8.00b	53.1c
F ₂ poly-crossed- progeny	97.7a	138.3a	4.6a	3.9a	3.16a	13.09a	83.2a

SI: Self-incompatible, SC: Self-compatible.

1) 1: poor~9: high, 2) 1: poor~9: good

Number followed by different letters are significantly different at 5% level according to Duncan's new multiple range test.

Table 4. Summary of growth rate of the callus derived from various explant sources in Trifolium species.

Section	Growth habit ^{a)}	Explants		
		Cotyledon	Hypocotyl	Root
<u>Lotoidea</u>	a	1.9	2.3	2.3
	p	1.7	2.1	2.1
<u>Paramesus</u>	a	2.3	2.0	2.0
<u>Mistyllus</u>	a	2.3	2.0	2.0
<u>Vesicaria</u>	a	2.5	2.0	2.0
<u>Chronosemium</u>	a	1.3	1.3	1.7
<u>Trifolium</u>	a	2.3	2.2	2.1
	p	1.9	2.0	2.0
<u>Trichocephalum</u>	a	1.8	1.6	1.5
<u>Involucrarium</u>	a	2.0	2.3	2.0
	p	1.5	2.0	2.0

Figure shows average value of callus growth index (1: slow callus growth, 2: intermediate, 3: rapid callus growth).

a) p: perennial, a: annual (including biennial).

Table 5. Results of interspecific hybridization between Trifolium ambiguum and T. repens by ovule culture method. Ovules were excised 5th day after pollination and cultured on various media.

Medium	No. of ovules inoculated (A)	No. of seeds germinated (B)	B/A	No. of plants obtained*
<u>T. ambiguum</u> (6x) × <u>T. repens</u>				
Basic + CH (0.2%)	49	1	0.02	0
Basic + CH (0.2%), cucumber juice (10%)	147	22	0.15	3
Basic + CH (0.2%), clover immature seed juice (10%)	40	4	0.10	1
<u>T. ambiguum</u> (4x) × <u>T. repens</u>				
Basic + CH (0.2%) cucumber juice (10%)	324	22	0.07	2

Basic : Minor modified Nitsch's major mineral, minor mineral and vitamins in Murashige and Skoog, 7% sucrose, 0.8% agar.

CH: Casein hydrolysate (Casamino acid).

* : Plants established in soil.

Table 6. The yield of plantlets from shoot tips 0.2-0.3 mm long on various culture media.

Medium	No. of shoot tips in culture (A)	No. of plantlets (B)	B/A
B5	32	10	0.30
MS	28	7	0.25
Modified White	56	22	0.39
Modified White + IAA 0.1 mg/l	45	25	0.56

Table 7. Data on the survival of cold stored shoots(at 4°C)

Time in storage (months)	No. of shoots in culture	Surviving shoots
3	10	9
6	10	9
9	10	9
12	10	9
18	16	8
24	25	5
36	19	0

Modified white + 0.1 mg/l IAA

Table 8 Survival of apical meristems of different cultivars of Trifolium frozen in LN.

Cultivar	Cold ¹⁾ hardiness	Survival rate(%±SE)
<u>T. repens</u>		
Kitaooha	8	96±4
Nora	8	78±11
Kent Wild	8	86±4
Grasslands Huia	6	92±2
Haifa	2	82±4
Nolin's Improved	2	83±6
<u>T. pratense</u>		
Sapporo	-	64±10
<u>T. alexandrinum</u>		
Camel	-	50±13

Samples were preculturing on agar B5 medium containing 5% DMSO and 5% glucose for 2 days at 4°C under continus light conditions. Pretreated meristems were frozen to -40°C at 0.3°C/min in the presence of 10% DMSO and 10% glucose. Thawed meristems were placed onto filter paper over agar B5 medium without washing. Survival was defined as the percentage of meristems showing normal growth one month after thawing. Approximately 20 meristems were tested for each of three replicates.

1) The degree of cold dardiness was rated from 1 (tender) to 9 (hardest).

Table 9. Effects of cryoprotectant on the survival of callus tissues immersed into LN after prefreezing at -30°C.

Cryoprotectant	Survival(%)
3M glycerol	76
2M glycerol	0
3M propylene glycol	8
2M propylene glycol	75
3M ethylene glycol	0
2M ethylene glycol	45

The callus tissues were treated with various cryoprotectants dissolved in liquid medium containing 0.5 M sucrose at 25°C for 10 min.

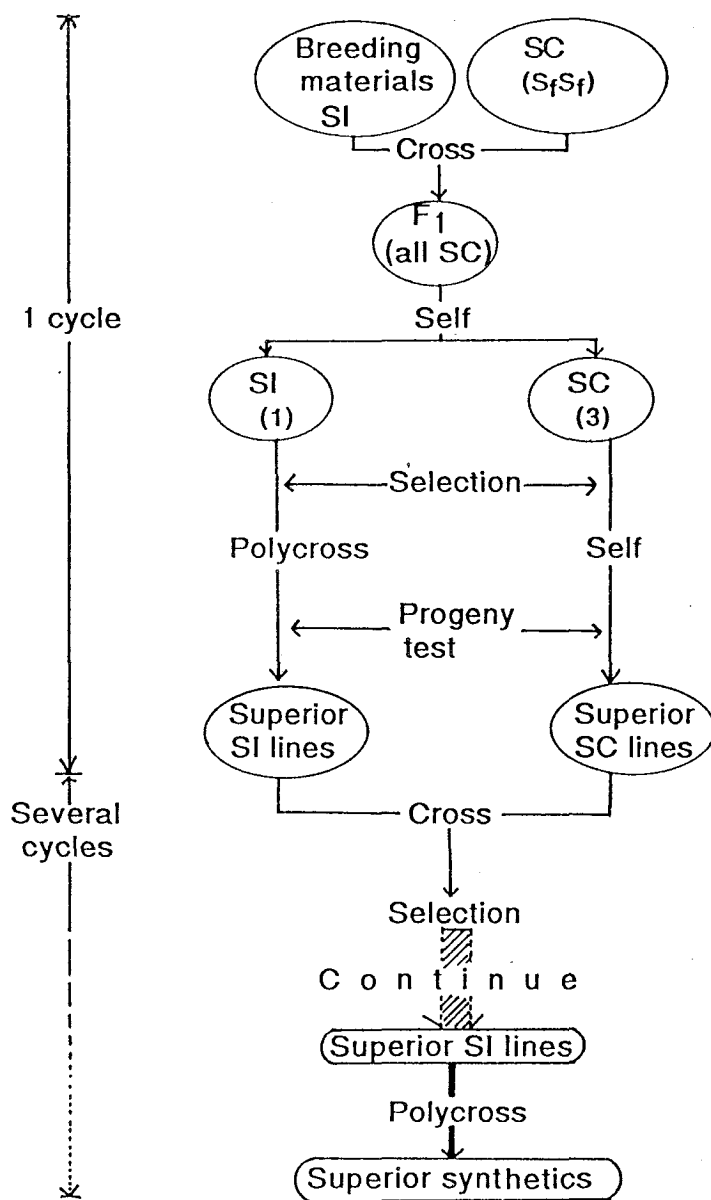


Fig. 4. Scheme of recurrent selection programs using self-compatibility in white clover

審査結果の要旨

本論文は、シロクローバの新品種育成のための基礎的知見を得ることを目的とした研究を展開して、その結果を取りまとめたものである。

まず、世界各国から収集したシロクローバ46品種の実用的特性を調査分析し、ラジノ、大型のコモン、小型のコモン、ワイルド型の4群に分化していることを示した。さらにシロクローバを含むトリフォリウム属の67種、76系統についての特性調査と54種についてのアイソザイムの変異調査を行い、これらの種の分化と類縁関係に考察を加えた。例えば、アイソザイム分析による近縁度と種間雑種の出来易さとの関係があるなど、これらの知見はシロクローバの取扱いの重要な基礎資料となる。

シロクローバは配偶体型の自家不和合性を有しているもので、その育種の際に自家受粉種子が容易に得られないことが問題であった。本研究では、シロクローバ集団中に自家和合性の遺伝子を発見した。この遺伝子を用いて自殖を繰り返すと近交弱勢が著しいが、それらを交雑すると雑種強勢の効果が現れることを示し、この遺伝子を利用することによって、合理的な循環選抜法を適用する道を開いた。この方法は、自家不和合性集団の育種法として注目される。

組織培養法を育種に利用する目的で、シロクローバ24品種を供試し、カルスから再分化可能な2品種を得た。この材料を用いて、プロトプラストを得、それから植物体を再分化させる実験系を示した。また、トリフォリウム属65種のカルス培養を行い、再分化可能な10種を得た。一方、胚珠培養を用いて、モザイク病抵抗性を持つクラクローバとシロクローバの種間雑種作成にも成功した。さらに、培養組織や生長点の超低温保存法を示した。シロクローバの育種においては優良クローンを栄養繁殖して利用することが多く、超低温保存法は有効な育種技術となると期待できる。

以上、本論文では、シロクローバの種内およびトリフォリウム属内の遺伝的特性の変異を調査する一方、シロクローバの効率よい選抜体系を示した。さらに、胚珠培養法を利用した中間母本の養成法、細胞の超低温保存技術による優良クローンの保存法なども提案している。これらの知見は育種学の展開に多くの貢献をなしたものであり、著者に農学博士の称号を授与するに値するものと判断した。